Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

نقش کارکردی ژن پراکسیداز در مقاومت گل شاخه بریده ژربرا (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook. f.) به عارضه خمیدگی ساقه گل‌دهنده

حمیده جابریان همدان[۱]، محمد مهدی سوهانی[۱*]، علی اعلمی[۱] و محمد جواد نظری دلجو[۲]

[۱] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

[۲] گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳)

چکیده

پراکسیداز از مهمترین ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی لیگنین است. مهم‌ترین کارکرد این آنزیم پلیمریزه کردن مشتقات فنلی به لیگنین، ایجاد ارتباط بین پلیمرهای دیواره سلولی و شکل‌گیری اتصال‌های متقابل منولیگنول‌ها و در نتیجه استحکام دیواره سلولی است. بر همین اساس، ژن پراکسیداز از گیاه ژربرا جداسازی و به منظور افزایش بیان ژن در وکتور بیانی PK7WG2 با سیستم گیت‌وی کلون شد. گل ژربرا رقم پانوراما با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* سویه PGV 3101 تراریزش و پس از باززایی، گیاهچه‌های تراریخت به گلخانه بدون خاک منتقل شدند. بررسی‌های مولکولی گیاهان تراریخته نسل دوم با استفاده از آزمون‌های PCR و Real Time-PCR تأیید کرد که هر دو ژن داخلی و تراژن در گیاهان تراریخته وجود داشته است. فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهان تراریخته به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. مطالعات فنوتیپی و فیزیولوژیکی نشان داد که گیاهان تراریخته به طور معنی‌داری عارضه خمیدگی کمتری در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند. همچنین شاخص‌های کیفی گل شامل ماندگاری و پایداری غشای سلولی در گیاهان تراریخته به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت. انتقال تراژن پراکسیداز ضمن بهبود پارمترهای کیفی گل و افزایش جذب آب توسط ساقه گل‌دهنده، به‌طور قابل توجهی عارضه خمیدگی ساقه گل‌دهنده ژربرا را کاهش داد.

کلمات کلیدی: بیوسنتز لیگنین، تراریزش ژربرا، کیفیت پس از برداشت، ماندگاری

مقدمه

گل ژربرا پس از رز، داوودی، لاله و لیلیوم با ارزش تجاری برابر با ۱۴۲ میلیون دلار مقام پنجم در بین گل‌های شاخه بریده را به خود اختصاص داده است (Floraholland, 2016). ژربرا از تیره مرکبان، دارای سرگل مرکب انتهایی یا طبق و ساقه‌های گل‌دهنده با طول ۵۰ الی ۷۰ سانتی‌متر است. خمیدگی ساقه یا گردن مهمترین عارضه و عامل تلفات پس از برداشت این گل است که عمدتاً در ناحیه ۱۰ سانتی‌متری زیر گل آذین اتفاق می‌افتد و منجر به خم شدن ساقه گل‌دهنده قبل از پژمردگی گلبرگ‌ها و در نتیجه کاهش ماندگاری گل می‌شود (Ferrante *et al*., 2007).

خمیدگی ساقه گل‌دهنده در ژربرا پدیده‌ای بسیار پیچیده و تحت تأثیر عوامل متعددی می‌باشد. بر اساس نتایج تحقیقات متعدد علاوه بر ژنتیک (Ferrante *et al*., 2007; Nazarideljou

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

et al., 2011) دو عامل کمبود و اتلاف آب ساقه گل‌دهنده و در نتیجه کاهش فشار تورژسانس و عدم استحکام مکانیکی ساقه از مهم‌ترین عوامل مؤثر در خمیدگی ساقه گل‌دهنده ژربرا است (Van Meeteren, 1978a,b; Dubuc-Lebreux and Vieth, 1985; van Doorn and Witte, 1994; Nazarideljou *et al*,. 2012). با توجه به مشاهدات Rene و همکاران (۲۰۱۲) عارضه خمیدگی ساقه ژربرا ارتباطی با حفره موجود در ساقه نداشته و فقدان حلقه‌های اسکلرانشیمی و کمبود لیگنین در قسمت‌های بالای ساقه عامل اصلی بروز این پدیده است. Guosheng و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی آناتومی و فیزیولوژی نهنج ساقه گل‌دهنده داوودی شاخه بریده گزارش کردند که ارقام با ماندگاری بالا حاوی عناصر آوندی، مقدار لیگنین و محتوای نسبی آب بیشتری در مقایسه با ارقام با ماندگاری کمتر بودند.

بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات، لیگنین یکی از پلیمرهای مهم و تقویت کننده استحکام دیواره سلولی و آنزیم پراکسیداز یکی از مهمترین آنزیم‌های مؤثر در مسیر بیوسنتز لیگنین است. بیشتر ژن‌های درگیر در سنتز مونولیگنول‌ها در گیاهان مدل از قبیل آرابیدوپسیس، تنباکو و سپیدار شناخته و کلون شده‌اند (Lauvergeat *et al*., 2001; Li *et al*., 2001; Welinder *et al*., 2002; Kim *et al*., 2004). براساس نتایج مطالعات متعدد، افزایش و کاهش تنظیم و بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های cinnamoyl-CoAreductase (CCR), (CAD) cinnamylalcohol dehydrogenase و peroxidase (POD) باعث تغییر مقادیر لیگنین در گیاهان تراریخت شده است (Whetten *et al*., 1998; Anterola and Lewis, 2002).

در مطالعات Yeh و همکاران (۲۰۱٤) سه آنزیم اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین (POD, CCR, CAD) به منظور افزایش استحکام بافت میوه توت فرنگی و افزایش عمر انبارداری آن بررسی و نتایج مطالعات آن‌ها مشخص کرد که در بین آنزیم‌های مورد مطالعه، افزایش بیان آنزیم پراکسیداز بیشترین تأثیر را بر تشکیل لیگنین و افزایش استحکام بافت میوه دارد. همچنین در میوه‌های تلقیح شده با *Agrobacterium*، آنزیم پراکسیداز به شدت و به طور دائم القا و فعالیت مؤثر این آنزیم در انتقال علایم و نقش دفاعی آن همزمان **با** افزایش تولید لیگنین در میوه‌ها مشاهده شد.

مهمترین کارکرد آنزیم پراکسیداز پلیمریزه کردن مشتقات فنلی به لیگنین (Boerjan *et al*., 2003; Weng and Chapple, 2010)، ایجاد اتصال بین پلیمرهای دیواره سلولی و شکل‌گیری اتصال‌های متقابل منولیگنول‌ها و در نتیجه عامل استحکام دیواره سلولی است. به عبارتی، پراکسیداز یک آنزیم ضروری در مسیر متابولیسم لیگنین و عامل پلیمریزه شدن رادیکال‌های فنوکسی منولیگنول به لیگنین است (Passardi, 2004; Ring *et al*., 2013).

در تحقیق حاضر گیاه تراریخت ژربرا با افزایش بیان ژن پراکسیداز تولید شد. تراریزش گیاهان با آزمون‌های متفاوت تأیید شد. در نهایت، تأثیر افزایش بیان ژن مذکور بر شاخص‌های کیفی گل از قبیل عارضه خم شدن ساقه گل شاخه بریده ژربرا مطالعه شده است.

مواد وروش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹٦– ۱۳۹۳ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و گروه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشگاه واخنینگن هلند انجام گرفت.

سازه ژنی و سویه باکتری: در این تحقیق از دو باکتری *E. coli* سویه DH5α و *Agrobacterium tumefaciens* سویه PGV 3101 (حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های اسپکتومایسین و ریفامپیسین؛ koncz *et al*., 1994) و ناقل بیانی گیت‌وی PK7WG2 (Karimi *et al*., 2002) استفاده شد. از باکتری *E. coli* جهت نگهداری و تکثیر ناقل و از *Agrobacterium* و ناقل بیانی گیت وی PK7WG2 جهت انتقال ژن پراکسیداز(*GhyPrx01*) و تراریزش گیاه ژربرا استفاده شد. ناقل بیانی گیت‌وی مورد استفاده در این آزمایش حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین تحت کنترل پیشبر CaMV 35S است. آغازگرهای اختصاصی ژن پراکسیداز مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با توالی‌های آغازگر پیشرو: 5´-CAC CAT GGC CAC CAA AGC TCT-3´ و آغازگر پیرو-5´-GCC GTT AAT GGT GTT TGT TTG C

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

´3براساس فناوری کلونینگ گیت‌وی و وجود توالی CACC در ابتدای آغازگر پیشرو با استفاده از برنامه oligoanalyser طراحی شدند.

کلونینگ و انتقال ژن با استفاده از فناوری گیت‌وی: استخراج RNA از ساقه و برگ گیاهان با استفاده از ترایزول (Invitrogen Life Technologies) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و سنتز رشته cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (فرمنتاز) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Pfu* DNA polymerase به صورت زیر انجام شد. رشته الگو (cDNA) ۲ میکرولیتر، هر یک از پرایمرها ۰/۵ µM، ۲U آنزیم *Pfu*، ٤ میکرولیتر بافر (5X) و آب دیونیزه تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر. چرخه‌های دمایی مورد استفاده PCR به ترتیب شامل ۹۸ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه; ۳۵ چرخه با واسرشت سازی ۹۸ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۵ درجه سانتیگراد ٤۰ ثانیه، بسط۷۲ درجه سانتیگراد ٤۰ ثانیه; بسط نهایی ۷۲ درجه ۷ دقیقه.

واکنش BP و LR **کلوناز:** به منظور کلون کردن ژن پراکسیداز، از وکتور pENTR™ Directional TOPO Invitrogen Coloning بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای ساخت وکتور اولیه ۵۰ نانو گرم از محصول PCR و ۵۰ نانوگرم ازTopo vector و برای ساخت کلون بیانی از واکنش LR Clonas II شامل ۳۰ نانوگرم از کلون اولیه و۵۰ نانوگرم از کلون نهایی (Destination vector) استفاده شد. محلول واکنش شامل ۲ میکرولیتر از وکتورهای ورودی و پذیرنده و ۱ میکرولیتر آب می‌باشد. این واکنش به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده و با اضافه کردن ۱ میکرولیتر پروتئیناز K غیرفعال می‌شود. پلاسمیدهای نوترکیب به سلول‌های مستعد باکتری *E.Coli* منتقل و در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک اسپکتومایسین گزینش شدند. کلونی‌های نوترکیب پس از تأیید نهایی و تعیین توالی نوکلئوتیدی به سویه‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* وارد شد.

انتقال ژن به گیاه ژربرا و باززایی نمونه‌ها: گیاهچه‌های درون شیشه‌ای گل ژربرا رقم 'Panorama' *Gerbera jamesonii Bolus ex*. Hook f. از شرکت Schreurs، (هلند) تهیه و برای انتقال ژن استفاده شد. بدین منظور تقریباً ۱۰۰ ریزنمونه ۱ سانتی‌متری دمبرگ در ٦ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اندام‌زایی (MS) حاوی هورمون‌های ایندول‌استیک اسید (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، زآتین (۱ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین (۱ میلی‌گرم در لیتر) و ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *Agrobacterium* (۰/٦ – ۰/۸ در OD600) به مدت دو روز در شرایط تاریکی و دمای محیط به آرامی با سرعت ۸۰ دور در دقیقه شیک شد. سپس ریزنمونه‌ها با سفاتوکسیم (۲۵۰ میلی گرم در لیتر) شستشو و به محیط کشت MS جامد منتقل شدند. همچنین آنتی بیوتیک گزینشگر کانامایسین(۵۰ میلی گرم در لیتر)، پس از یک هفته به محیط کشت MS جامد اضافه شد (Elomaa *et al*., 1998). قطعات دمبرگ بدون هم‌کشتی با باکتری به عنوان شاهد جهت مقایسه استفاده شد. گیاهان انتخاب شده بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر)، پس از ریشه زایی درمحیط MS بدون هورمون، با شرایط گلخانه سازگار و نهایتاً به گلخانه بدون خاک و با شرایط محیطی کنترل شده به‌ترتیب با دوره روشنایی و تاریکی ١٦ و ۸ ساعت، دمای شب و روز به‌ترتیب ۱۹ و ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵٪ ± ٦۰ منتقل شدند (شکل۲ e - f). گیاهچه‌های تراریخت منتقل شده به گلدان‌های ٦ لیتری حاوی بستر کوکوفیبر و پرلایت (۵۰:۵۰ حجمی) پس از یک هفته آبیاری با آب معمولی، روزانه با محلول غذایی (هدایت الکتریکی۱/۲ دسی زیمنس‌برمتر و پی اچ برابر ٦) محلول‌دهی شدند (Mercurio, 2004).

آنالیز بیان ژن پراکسیداز در گیاهان تراریخته: به منظور سنجش بیان ژن پراکسیداز آزمایشات qRT-PCR با بهره‌گیری از دستگاه Bio Rad و همچنین کیت (BIO-RAD, iQ Syber Green Supermix) استفاده شد. در واکنش qRT-PCR ازآغازگرهای اختصاصی ژن پراکسیداز با توالی‌های آغازگر پیشرو:´5-GTA CGT GCG AAA TGA CCG TG-3´ و آغازگر پیرو´5-CGT CCT CTT GTC TGT TGC CA-3´

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

استفاده شد. ۱ میکرولیتر از cDNA، ۰/٤ µM از آغازگرها، ٦/۲۵ میکرولیتر از محلول کیت SYBR Grean، با آب به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر رسانیده شد. پروفایل دمایی شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه; برای مرحله واسرشتی اولیه، ٤۰ سیکل شامل (۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه برای مرحله واسرشتی، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه برای مرحله اتصال و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه برای مرحله گسترش) و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه برای مرحله گسترش نهایی بود. نرمال سازی با استفاده از اکتین با توالی‌های آغازگر پیشرو: 5´-TCC CGA GTA TTG TTG GTC GT-3´ و آغازگر پیرو: 5´-TCC ATG TCA TCC CAG TTG CT-3´ و از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak *et al.*, 2001) انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس تبدیل گایاکول به تتراگایاکول به روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) سنجیده شد. در این روش گایاکول در حضور الکترون‌های ناشی از تجزیه پراکسید هیدروژن با آنزیم به تتراگایاکول تبدیل شده و تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج٤۷۰ نانومتر ثبت گردید. به منظور تهیهٔ عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (pH= ۷) استفاده شد. بدین منظور پس از آسیاب کردن ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه (ساقه و برگ) در حضور ازت مایع و انتقال آن به تیوب ۲ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار حاوی ۲ درصد PVPP و ۱/۳ میلی مولار EDTA، به آن اضافه شد. برای اندازه‌گیری هر نمونه ٤۵۰ میکرولیتر از بافر آب اکسیژنه و ٤۵۰ میکرولیتر از بافر گایاکول در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) با هم مخلوط و به آن ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه و نهایتاً اکسیداسیون گایاکول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در طول موج ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش پارامترهای کیفی گل شاخه بریده ژربرا: قطر گل‌آذین و طول ساقه گل‌دهنده از مهم‌ترین شاخص‌های کیفیت گل شاخه بریده ژربرا است که با استفاده از کولیس دیجیتالی و خط‌کش ثبت شد. همچنین تغییرات روزانه وزن تر ساقه گل‌دهنده پس از برداشت اندازه‌گیری شد. برای توزین، در زمان حدود ۳۰ ثانیه هر شاخه گل به سرعت از محلول خارج، آب اطراف ساقه خشک و وزن آن با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. جذب آب توسط ساقه گل‌دهنده به صورت روزانه اندازه‌گیری و برحسب گرم برگرم وزن تر ارائه شد. حجم آب جذب شده با اندازه‌گیری تفاوت کاهش حجم محلول در مقایسه ظرف فاقد گل و ظروف حاوی گل اندازه‌گیری شد (He *et al.*, 2006).

پایداری غشای سلولی گلبرگ: پایداری غشای سلولی گلبرگ‌ها در روز پنجم پس از برداشت با استفاده از سنجش هدایت الکتریکی بافت گلبرگ در دمای معمولی (EC_1) و دمای ۹۵ درجه سلسیوس (EC_2) با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه ذیل محاسبه گردید (Poovaiah and Leopold, 1973)

رابطه۱ $\frac{EC\,1}{EC2}\times 100$ = درصد نشت یونی

ماندگاری گل و خمیدگی ساقه گل‌دهنده: پژمردگی و تغییر رنگ، کاهش شادابی و تورژسانس گلبرگ و خمیدگی ساقه گل‌دهنده بیش از ۹۰ درجه مهم‌ترین شاخص‌های سنجش ماندگاری گل ژربرا هستند. خمیدگی ساقه گل‌دهنده در ٤ کلاس مختلف (کلاس ۱: خمیدگی بین ۲۵-۱۵درجه، کلاس ۲: خمیدگی بین ٦۵-۲۵ درجه، کلاس ۳: خمیدگی بین۹۰-٦۵ درجه، کلاس ٤: خمیدگی بیش از ۹۰ درجه) براساس روش Celikle و Reid (۲۰۰۲) و با استفاده از سنجش روزانه انحناء ساقه‌ها با استفاده از نقاله و کاغذ شطرنجی، از طریق تفاوت زاویه بین ساقه گل‌دهنده و رأس گل اندازه‌گیری و ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های مربوط به بررسی شاخص‌های پس ازبرداشت تیمارهای مورد بررسی (گیاهان تراریخته و شاهد) در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با ٦ تکرار(۳ گیاه در هر واحد آزمایشی) بررسی شد. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ محاسبه شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

احتمال ۱ درصد انجام گردید.

نتایج

بررسی گیاهان تراریخته و تأیید حضور ژن *POD* با انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR): نتایج به دست آمده بیانگر انتقال موفقیت آمیز ناقل مقصد به سلول‌های مستعد *Agrobacterium* بود. پس از انتقال ناقل بیانی PK7WG2 به سلول‌های مستعد *Agrobacterium*، کلونی‌های نوترکیب در سطح محیط کشت گزینشی LB مشاهده شد.

ردیابی ژن انتقالی در ژنوم گیاهان تراریخته به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر بررسی شدند. بر اساس نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز در هر گیاه تراریخت احتمالی دو باند مشاهده شد (شکل۱). قطعه تکثیری اول که درتمام گیاهان (اعم از تراریخته و شاهد) قابل مشاهده بود مربوط به ژن پراکسیداز داخلی گیاه است که به دلیل حضور اینترون‌ها طویل‌تر از تراژن و قطعه تکثیر شده دوم با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز مربوط به تراژن است که قاعدتاً فقط در گیاهان تراریخته احتمالی قابل مشاهده بود. اندازه قطعه تکثیری ژن داخلی در گیاهان شاهد و تراریخته یکسان بود. این نتایج نشان می‌دهند که گیاهان تراریخته احتمالی علاوه بر ژن پراکسیداز داخلی دارای تراژن پراکسیداز نیز هستند در حالیکه، گیاهان شاهد تنها دارای ژن پراکسیداز داخلی هستند. این آزمون اولین گام در اثبات حضور تراژن در گیاهان تراریخته بود.

انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها: ٦ تا ٨ هفته بعد از تلقیح قطعات دمبرگ، کالوس‌های تراریخت احتمالی در محیط کانامایسین سبز ماندند و به خوبی از نمونه‌های غیرتراریخت قابل شناسایی بودند. نمونه‌های غیرتراریخت در همان مدت سفید شده از بین رفتند (شکل a ۲). پس از دو تا سه هفته جوانه‌ها از کالوس باززایی و ساقه‌ها جهت ریشه‌زایی به محیط بدون هورمون منتقل شدند (c ۲). پس از ۹۰ روز گیاه کامل مقاوم و احتمالاً تراریخت از آنها به دست آمد. طی ۲ بار تلقیح با اگروباکتریوم ۱۰ پلیت حاوی ۱۰ قطعه دمبرگ در هربار استفاده شد و علاوه بر آن، در هر بار دو پتری حاوی قطعات دمبرگ بدون تلقیح با اگروباکتریوم به عنوان شاهد جهت مقایسه درنظر گرفته شد. براین اساس، از ۲۰۰ قطعه دمبرگ تلقیح شده با اگروباکتریوم ۳۰ عدد از نمونه‌ها باززایی و گیاه تراریخت تولید شد (شکل b ۲). سپس گیاهچه‌های سبز با ارتفاع مناسب به عنوان گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های ٦ لیتری حاوی بستر کوکوفیبر- پرلایت (۵۰:۵۰ حجمی) و گلخانه منتقل و مورد ارزیابی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی قرار گرفتند (شکل ۲d- e).

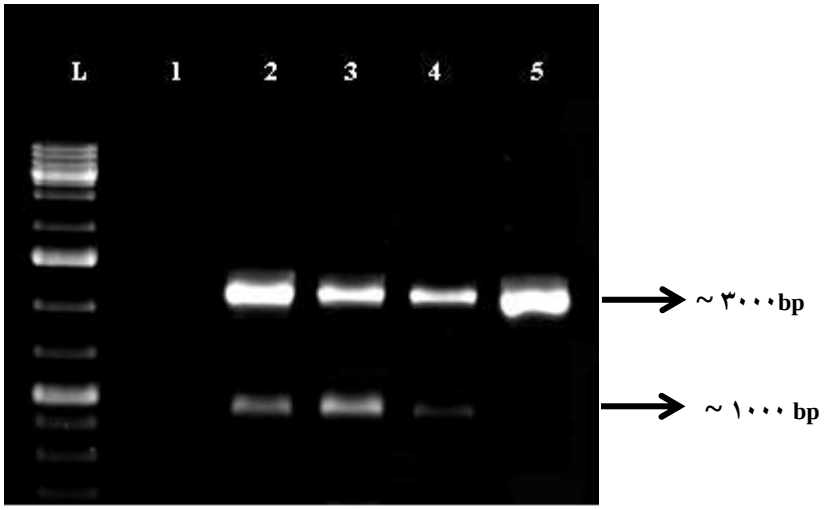
آنالیزبیان ژن *POD* در گیاهان تراریخته با انجام واکنش qRT-PCR: در این بخش از آزمایش، الگوی بیان ژن پراکسیداز در زمان گلدهی در بافت‌های ساقه و برگ بررسی شد. نمودارهای ذوب نمونه‌های مختلف نشان دادند که آغازگرهای *POD* به صورت اختصاصی عمل کرده‌اند. قطعه تکثیر شده توسط این آغازگرها ۱۱۸ جفت باز بود. نمودارهای تکثیر نشان دادند که میزان بیان در نمونه‌های شاهد نسبت به نمونه‌های تراریخته و در بافت‌های برگ و ساقه متفاوت است. براین اساس، بیان *POD* در بافت ساقه گیاهان تراریخت به طور معنی‌داری افزایش نشان داد و میزان آن تقریباً ۱۰ برابر بیان در گیاهان شاهد بود. همچنین الگوی بیان *POD* در بافت برگ تقریباً ٤ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری است. این نتایج در کل نشان داد که حضور نسخه یا نسخه‌های تراژن پراکسیداز در گیاه ژربرا باعث افزایش بیان معنی‌دار این ژن شده است.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد دارای فعالیت آنزیمی بیشتری بودند ($P<0.01$). میزان فعالیت این آنزیم در گیاهان تراریخته حدوداً ۲ برابر بیشتر از رقم شاهد بود (شکل ٤). بر اساس نتایج بافت ساقه گیاهان تراریخت بدون یا با حداقل خمیدگی، دارای میزان فعالیت پراکسیدازی بیشتری (۹/۸۳۵ $\mu mol\ H_2O_2\ min^{-1}\ mg^{-1}FW$) نسبت به گیاهان شاهد با درصد خمیدگی زیاد و فعالیت پراکسیدازی کمتر (٤/۱۹ $\mu mol\ H_2O_2\ min^{-1}.mg^{-1}FW$) بودند.

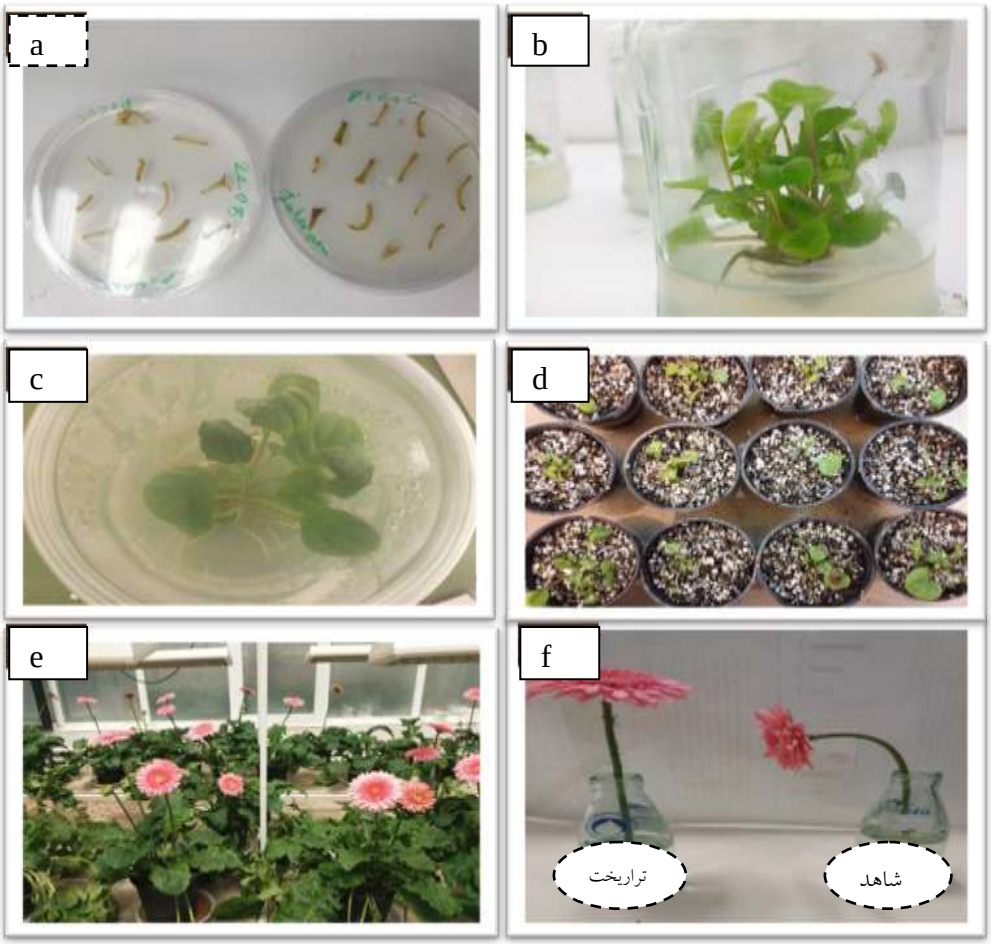
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019



شکل ۱- نتایج حاصل از تکثیر PCR ژن پراکسیداز در گیاهان ژربرا. L نشانگر1Kb، چاهک ۱ کنترل منفی با آب، چاهک‌های ۲ تا ٤ گیاهان تراریخته، چاهک ۵ گیاه غیرتراریخت.

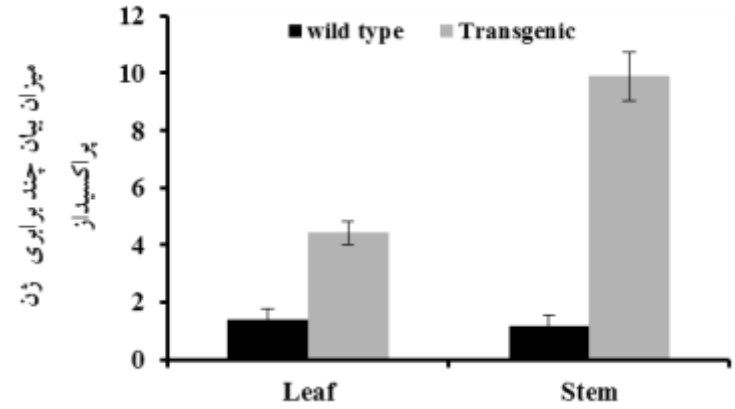


شکل ۲- مراحل تولید گیاهان تراریخت ژربرا با استفاده *Agrobacterium*؛ a- غربالگری و گزینش ریزنمونه‌های تلقیح شده با *Agrobacterium* بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین؛ b- باززایی و رشد جوانه‌های دمبرگ بر روی محیط کشت گزینشی؛ c- ریشه‌دار شدن ساقه‌ها در محیط بدون هورمون؛ d- مرحله سازگاری و انتقال گیاهچه‌های تراریخت به بستر کشت؛ e- بوته‌های بالغ ژربرا در مرحله گلدهی؛f - بررسی پس از برداشت عارضه خمیدگی ساقه گل دهنده در گیاهان تراریخت و شاهد.

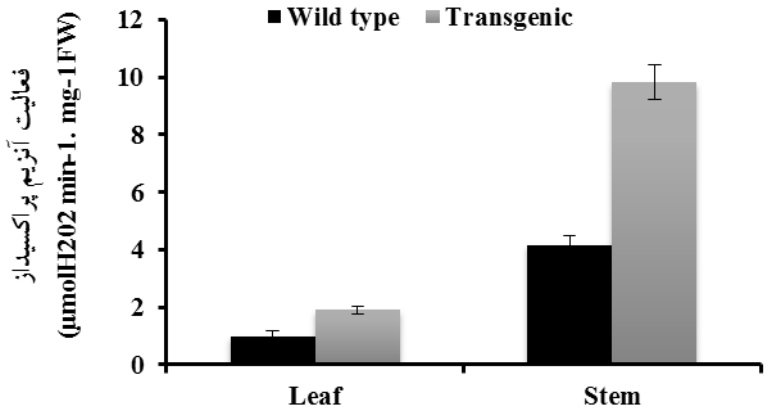
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019



شکل ۳- مقایسه بیان ژن پراکسیداز در بافت برگ و ساقه گیاهان شاهد و تراریخته ژربرا. (میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشد).



شکل ٤- فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت برگ و ساقه گیاهان تراریخت و شاهد ژربرا. (میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشد).

میزان فعالیت پراکسیدازی در بافت برگی گیاهان تراریخت (۱/۹۱۲µmol H_2O_2 $min^{-1}.mg^{-1}FW$) بیشتر از گیاهان شاهد (۰/۰۹۹۷ µmol H_2O_2 $min^{-1}.mg^{-1}FW$) بود. همچنین میزان فعالیت این آنزیم در ساقه گیاهان تراریخت (µmol H_2O_2 min^{-} ۹/۸۳۵$^{1}.mg^{-1}FW$) نسبت به برگ گیاهان تراریخت (۱/۹۱۲µmol H_2O_2 $min^{-1}.mg^{-1}FW$) به طور معنی‌داری افزایش نشان داد.

سنجش شاخص‌های کیفی گل شاخه بریده ژربرا: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، میزان خمیدگی ساقه در گیاهان تراریخته در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0.01$) (جدول ۱). میزان خمیدگی ساقه گل‌دهنده در تمام گیاهان از روز اول تا روز سوم آزمایش ثابت و سپس افزایش نشان داد؛ لیکن افزایش خمیدگی در گیاهان تراریخته به طور چشمگیری کمتر از گیاهان شاهد بود (۲ ه). روز ششم آزمایش گیاهان شاهد با میانگین درجه خمیدگی ۱۰/۸۳ در مقایسه با گیاهان تراریخته با میانگین درجه خمیدگی ٤ اختلاف معنی‌داری نشان دادند. درجه خمیدگی ساقه در گیاهان شاهد تا زمان پژمردگی کامل گیاهان همچنان به‌طور معنی‌داری بالاتر ازگیاهان تراریخته در زمان‌های مذکور بود. به‌طوریکه در روز پانزدهم پس از برداشت بیشترین اختلاف در میزان خمیدگی در گیاهان شاهد با میانگین درجه خمیدگی ۵۷/۵۰ در مقایسه با گیاهان تراریخته با میانگین درجه خمیدگی ۱۳/۳۳ مشاهده شد (شکل ۵). نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش بیان ژن پراکسیداز در گیاهان تراریخته به طور معنی‌داری باعث کاهش عارضه خمیدگی ساقه شده است.

همچنین از روز اول تا روز سوم، وزن تر گل‌ها در گیاهان

www.SID.ir

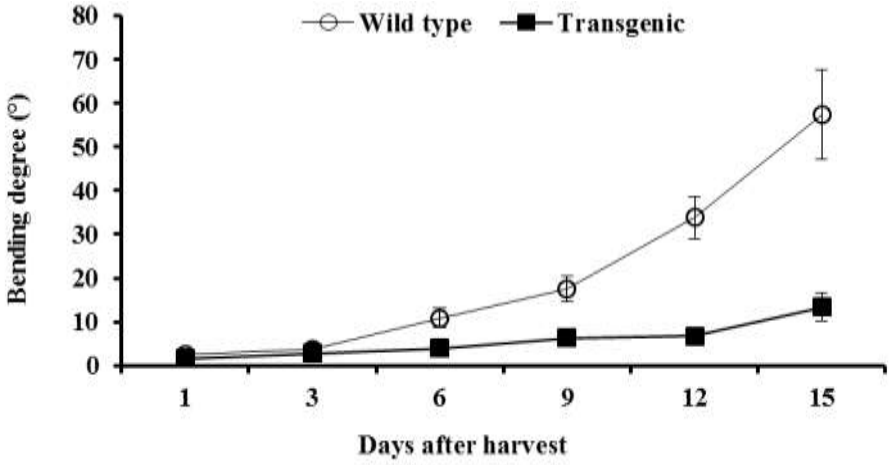
Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

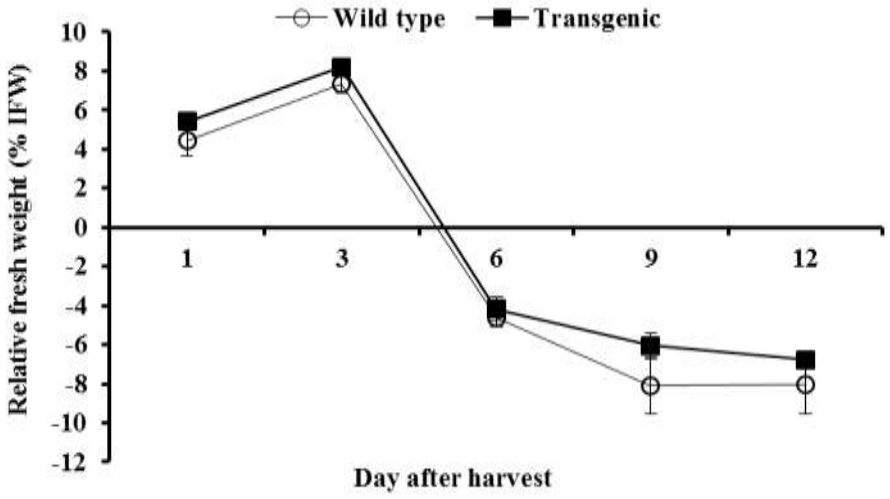
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات کیفی، خمیدگی و ماندگاری گل شاخه بریده ژربرا در گیاهان شاهد و تراریخته

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		ماندگاری	نشت یونی	جذب آب توسط ساقه گل‌دهنده	خمیدگی ساقه	قطر گل
شاهد وتراریخته	۱	۷۵	۱۷/٦۱**	۰/۱۰۱**	۵۸۵۲/۰۸	۵/۱٦
اشتباه آزمایشی	۱۰	۳/۳	۱/٤	۰/۰۰۸۲	٤۱۷/۰۸	۲/۸۰
ضریب تغییرات (٪)		۱۰/۰۹	۱۵/۹۷	۱۵/۸۸	۲۷/٤۲	۱۵/۳۲

** معنی داری در سطح ۱ درصد



شکل۵- درجه خمیدگی ساقه گل‌دهنده در گیاهان تراریخته و شاهد ژربرا. (میانگین داده ها ± خطای استاندارد).



شکل ٦- درصد تغییرات وزن تر ساقه گل‌دهنده در گیاهان ژربرای تراریخته و شاهد در طی ۱۲ روز پس از برداشت. (میانگین داده ها ± خطای استاندارد).

شاهد و تراریخته به ترتیب با میانگین ۸ و ۸/۱۸ درصد افزایش و از روز سوم به بعد کاهش یافت (شکل ٦). بیشترین میزان کاهش در روز نهم آزمایش در گیاهان شاهد با میانگین ۸/۱۳- درصد و در گیاهان تراریخته با میانگین ٦/۰۳- درصد مشاهده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات کیفی و ماندگاری گل شاخه بریده ژربرا در گیاهان شاهد و تراریخته

تیمار	ماندگاری (روز)	نشت یونی (درصد)	جذب آب (گرم بر گرم وزن تر بر روز)	قطر گل (میلی متر)
شاهد	۱۵/۵[b*]	۸/۶۲[a]	۰/۴۸۱[b]	۱۰۲[a]
تراریخته	۲۰/۵[a]	۶/۲۰[b]	۰/۶۶۵[a]	۱۱۵[a]

* **میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون توکی در سطح آماری ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.**

شد. بر همین اساس تغییرات وزن تر ساقه گل‌دهنده در روزهای پس ازبرداشت تفاوت معنی‌داری نشان داد.

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، گل‌های شاخه بریده تراریخته به‌طور معنی‌داری دارای محتوای آبی بیشتر، بهبود انتقال آب در آوندهای ساقه‌های گل‌دهنده و متعاقباً وزن‌تر بیشتری در مقایسه با گل‌های شاهد بودند. نتایج جدول ۲ بیانگر ارتباط بین توانایی جذب آب، درصد نشت یونی و نیز ماندگاری گل‌های شاخه بریده ژربرا است. اختلاف معنی‌داری در گیاهان تراریخته با مقدار آب بیشتر (۰/۶۶۵ گرم بر گرم وزن تر بر روز)، درصد نشت یونی کمتر (۶/۲۰)، درصد خمیدگی کمتر (۱۳/۳۳) و ماندگاری بیشتر (۲۰/۵ روز) در مقایسه با گیاهان شاهد با مقدار آب کمتر (۰/۴۸۱ میلی لیتر بر گرم وزن تر بر روز)، درصد نشت یونی بیشتر (۸/۶۲)، درصد خمیدگی بیشتر (۵۷/۵۰) و ماندگاری کمتر (۱۵/۵روز) مشاهده شد. براساس نتایج، رابطه نزدیکی بین ماندگاری و درصد نشت یونی وجود دارد. طبق نتایج آزمایش تمامی گیاهان تقریباً روندی مشابه در جذب آب داشتند، به‌طوریکه در ابتدای آزمایش یک روند صعودی و سپس نزولی نشان دادند؛ اختلاف در جذب آب به‌طور عمده بیانگر پتانسیل و توانایی گیاه در جذب انتقال و از دست دادن آب می‌باشد.

بحث

عارضه خمیدگی ساقه مهمترین عامل تلفات پس از برداشت گل شاخه بریده ژربرا است. بر اساس تحقیقات انجام شده در این زمینه، همبستگی معنی‌داری بین خمیدگی ساقه و کمبود لیگنین در ساقه‌های خم شده ژربرا مشاهده شده است. نتایج مطالعات متعدد نشان داده است که افزایش و یا کاهش بیان ژن‌های *CAD*, *CCR* و *POD* باعث تغییر مقادیر لیگنین در گیاهان تراریخت شده است (Whetten *et al*., 1998; Anterola and Lewis, 2002). آنزیم پراکسیداز در فرایند تشکیل لیگنین باعث کامل شدن پلیمریزاسیون مونولیگنول‌ها و با فعالیت اکسیداسیونی باعث تجمع مواد فنلی و در نتیجه تشکیل لیگنین می‌شود (Imberty *et al*., 1985). بنابراین، با توجه به نقش مهم و کلیدی ژن پراکسیداز در مسیر بیوسنتز لیگنین در این تحقیق افزایش بیان این ژن، در گل شاخه بریده ژربرا مطالعه شد و تأثیر این افزایش بیان بر تجمع احتمالی لیگنین و تأثیر آن بر عارضه خم شدن ساقه، بهبود کیفیت گل‌های شاخه بریده، و ماندگاری بررسی شد.

در این مطالعه ریزنمونه‌های دمبرگی ژربرا به‌طور موفقیت‌آمیزی توسط ناقل گیاهی بیانی PK7WG2 با واسطه *Agrobacterium* تراریزش شدند. حضور ژن پراکسیداز و بیان آن در گیاهان تراریخته نیز با بررسی‌های مولکولی شامل PCR و qRT-PCR تأیید شد. بر اساس نتایج آزمایش گیاهان تراریخته، خمیدگی ساقه کمتر و فعالیت POD بیشتر (۹/۸۳۵µmol H_2O_2 min^{-1} .mg^{-1} pro) نسبت به گیاهان شاهد با فعالیت آنزیمی µmol H_2O_2 .min^{-1} .mg^{-1} pro ۴/۱۹ و خمیدگی بیشتر ساقه را نشان دادند. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش (شکل ۴) احتمالاً بتوان POD را آنزیمی کلیدی در افزایش استحکام ساقه و در نتیجه بهبود عارضه خمیدگی ساقه در ژربرا معرفی کرد.

Cai و همکاران (۲۰۰۶) پدیده لیگنینی‌شدن پس از برداشت میوه Loquat را با اندازه‌گیری میزان فعالیت سه آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

CAD, PAL و POD در میوه بررسی کردند. نتایج نشان داد که استحکام میوه و در نتیجه مقدار لیگنین پس از برداشت افزایش یافته و این افزایش در مقدار لیگنین در نتیجه افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی لیگنین رخ داده است. آن‌ها به نقش مستقیم آنزیم پراکسیداز در پلیمریزاسیون مونولیگنول‌ها و رابطه‌ی مستقیم بین تغییر عملکرد پراکسیداز و سنتز لیگنین اشاره کرده‌اند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم پراکسیداز کاندیدای اصلی برای ایفای نقش مؤثر در بهبود استحکام ساقه و کاهش عارضه خمیدگی ساقه گل‌دهنده ژربرا است.

آزمون qRT-PCR نشان داد که بیان تراژن پراکسیداز در ساقه گیاهان تراریخته تقریباً ۱۰ برابرنسبت به شاهد و در بافت‌های برگی تقریباً ٤ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (شکل ۳). تفاوت‌های کمی در بیان تراژن به تفاوت تأثیرات DNA کروموزومی مجاور تراژن نسبت داده می‌شود. این تفاوت‌های کمی که به محل ورود تراژن در ژنوم بستگی دارند با عنوان اثر موضعی شناخته می‌شوند (Blundy *et al.*, 1991; Peach and Veltern, 1991; Mlynarova *et al.*, 1994; Dean *et al.*, 1998). ساختار کروماتین در اطراف محل تراژن ممکن است باعث تفاوت در دسترسی عوامل رونویسی شود (Dean *et al.*, 1998).

بر اساس شکل ۵ میزان خمیدگی ساقه در اولین روزهای پس از برداشت در گیاهان شاهد و تراریخته دارای تفاوت اندک لیکن با افزایش ماندگاری تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. این امر احتمالاً به علت بهبود جذب آب توسط آوندهای چوبی ساقه، افزایش محتوای آبی ساقه و افزایش استحکام ساقه است. در آزمایش مشابهی Van Meeteren (۱۹۷۸) مشاهده کرد که ۳ روز قبل از خمیدگی ساقه ژربرا، جذب آب و وزن تر ساقه شدیداً کاهش یافته و نهایتاً منجر به خمیدگی ساقه شد. درحالیکه بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه، انسداد آوندی ساقه در ۵ سانتی‌متری پایین ساقه را که باعث عدم جذب آب می‌شود، مهم‌ترین عامل در خمیدگی ساقه معرفی کرده‌اند (Van Meeteren, 1978a; He *et al.*, 2009; De Witte *et al.*, 2014; Perik *et al.*, 2014; Wang, 2014; Hema *et al.*, 2015). اخیراً Yan (۲۰۱٦) با بررسی اثر ساکارز بر خمیدگی و ماندگاری گل ژربرا نتیجه گرفت که عدم استحکام مکانیکی ساقه، بیشتر از جذب آب و انسداد آوندی در عارضه خمیدگی ساقه در ژربرا مؤثر است. در واقع لیگنین علاوه بر تأثیر بسزایی که در استحکام و حالت رشد ایستاده ساقه دارد نقش مهمی در کمک به هدایت و انتقال آب در آوندهای چوبی ایفا می‌کند (Vanholme *et al.*, 2010). بنابراین، در این آزمایش نیز که گیاهان تراریخته دارای محتوای آبی، وزن‌تر و ماندگاری بیشتری در مقایسه با گل‌های شاهد بودند احتمالاً تجمع لیگنین به دلیل افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز باعث افزایش جذب آب، بهبود انتقال آب در آوندهای ساقه و درنتیجه کاهش خمیدگی ساقه در گیاهان تراریخته شده است.

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش گیاهان شاهد و تراریخته تقریباً روند مشابهی را در جذب آب داشتند، به طوریکه در ابتدای آزمایش یک روند صعودی و سپس نزولی نشان دادند. همان طور که در نتایج ذکر شد (جدول ۲)، کاهش در جذب آب در بین گیاهان شاهد بیشتر از گیاهان تراریخته بود؛ که عمدتاً بیانگر پتانسیل و توانایی متفاوت گیاه در جذب، انتقال و از دست دادن آب می‌باشد. به‌علاوه عواملی از قبیل انسداد آوندی ناشی از باکتری‌ها، هوا کشیدن ساقه گل‌دهنده، تایلوز و غیره نیز منجر به کاهش جذب آب توسط ساقه گل‌دهنده می‌شوند(Hoogerwerf and Van Doorn, 1992; Bhattasharjee and De, 2005).

زمانی‌که گلبرگ‌ها یا ساقه، تورژسانس و شادابی خود را به‌طور کامل از دست دادند، عمر گل پایان یافته تلقی می‌شود. بر اساس نتایج آزمایش ماندگاری گل در گیاهان تراریخته با میانگین ۲۰/۵ روز به طور معنی‌داری در مقایسه با گیاهان شاهد با میانگین ۱۵/۵ روز افزایش یافت. فرانتی و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی تأثیر فعالیت آنزیم PAL بر روی ارقام مختلف ژربرا نشان دادند که ژنتیک نقش بسزایی در ماندگاری گل و خمیدگی ساقه دارد. عمر پس از برداشت گل‌های شاخه بریده عمدتاً تحت تأثیر فاکتورهای قبل از برداشت همچون ژنتیک، نور، دما، خاک، مواد غذایی، رطوبت نسبی، تغذیه،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

آفات و بیماری ها قرار می‌گیرد.

تغییرات نشت یونی (نفوذ پذیری غشای سلولی) می‌تواند عامل تغییر و تفاوت در ماندگاری عمل کند (Baur and Workman, 1964; Bir and Bramlage, 1973)؛ چنانچه بافت‌های با نفوذپذیری نرمال توانایی حفظ جذب آب و املاح بیشتری دارند (Van Meeteren, 1979). عدم تعادل در وضعیت آبی گل شاخه بریده بر عمر پس از برداشت آن مؤثر می‌باشد. مهم‌ترین علائم عدم تعادل آبی شامل پژمردگی، خمیدگی شاخه و عدم باز شدن کامل گل‌ها می‌باشد (Halvey and Mayak, 1979). نقصان نفوذپذیری غشاء سلولی توسط افزایش نشت یونی سلول سنجیده می‌شود. افزایش در نشت یونی نشان دهنده کاهش توانایی غشاء سلولی در حفظ خاصیت نفوذپذیری و از جمله مهمترین علایم پیری در بافت یا اندام می‌باشد. شکست غشاء سلولی تغییرات فیزیولوژیکی (افزایش تولید اتیلن و اسید ابسیسیک، کاهش جذب سوکروز و کاهش فعالیت ATPase) را که منجر به پیری گلبرگ‌ها و گل‌ها می‌شود جلو می‌اندازد. نتایج این آزمایش با نتایج تحقیقات Nazarideljou و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت و همخوانی دارد که بیان کردند ارقام با ماندگاری بیشتر دارای نشت یونی کمتری می‌باشند.

قطر گل از جمله صفاتی است که در تحقیقات متعددی در زمینه دوام عمر گل‌های شاخه بریده بررسی شده است (Ferrante *et al*., 2002; Hunter *et al*., 2004; Emongor, 2004). در گیاهان تراریخته افزایش قطر گل به سبب افزایش محتوی آبی و جذب محلول سبب افزایش کیفیت و دوام گل می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج این تحقیق تراژن پراکسیداز در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد منجر به افزایش بیان آنزیم پراکسیداز و افزایش فعالیت آنزیمی و کاهش خمیدگی ساقه ژربرا شد. همچنین صفات کیفی گل از جمله قطر گل، پایداری غشای سلولی و ماندگاری گل در گیاهان تراریخته به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت.

تشکر و قدردانی

از مدیر محترم گروه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشگاه واخنینگن هلند پروفسور Richard G. F. Visser به دلیل همکاری بسیار صمیمانه و همچنین پروفسور Paul Arens بخاطرراهنمایی‌های ارزنده و فراهم نمودن تسهیلات لازم برای انجام بخشی از این پژوهش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Anterola, A. and Lewis, N. G. (2002) Trends in lignin modification, a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. Phytochemistry 61: 221–294.

Baur, J. R. and Workman, M. (1964) Relationship between cell perm ability and respiration in ripening banana fruit tissue. Plant Physiology 39: 540-543.

Bhattasharjee, S. K. and De, L. C. (2005) Postharvest Technology of Flowers and Ornamental Plants. The Diamond Printing Press Jaipur, India.

Bir, R. E. and Bramlage W. J. (1973) Assessing ion leakage from apple fruit tissue. Horticulture Science 8: 175-176.

Blundy, K. S., Blundy, M. A. C., Carter, D., Wilson, F. and Park, W. D. (1991) The expression of class I patatin gene fusions in transgenic potato varies with both gene and cultivar. Plant Molecular Biology 16: 153-160.

Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003) Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 54: 519-546.

Cai, C., Xu, C., Li, X., Ferguson, I. and Chen, K. (2006) Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignifications enzymes in loquat fruit after harvest. Postharvest Biology and Technology 40: 163-169.

Celikle, F. G. and Reid, M. S. (2002) Storage temperature affects the quality of the cut flowers from the Asteraceae. Hortscience 37: 148-150.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. Methods Enzymology 2:764-775.

De Witte, Y., Harkema, H. and Van Doorn, W. G. (2014) Effect of antimicrobial compounds on cut Gerbera flowers: Poor relation between stem bending and numbers of bacteria in the vase water. Postharvest Biology and Technology 91: 78-83.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

Dean, C., Jones, J., Favreau, M., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J. (1998) Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. Nucleic Acid Research 16: 9267-9283.

Dubuc-Lebreux, M. A. and Vieth, J. (1985) Histologie du pedoncule inflorescentiel de *Gerbera jamesonii*. Acta Botanica Neerlandica 34: 171–182.

Elomaa, P. T. and Teeri, H. (1998) Transgenic Gerbera. Transgenic Crops III. Part of the Biotechnology in Agriculture and Forestry Book Series.

Emongor, V. E. (2004) Effect of gibelerllic acid on postharvest quality and vase life of Gerbera Cut Flowers (*Gerbera jamesonii*). Agronomy 3: 191-195.

Ferrante, A., Hunter, D. H., Hackett, W. P. and Reid, M. (2002) Thidiazuron – a potent inhibitor of leaf senescence in alstromeria. Postharvest Biology and Technology 25: 333-338.

Ferrante, A., Alberici, A., Antonacci, S. and Serra, G. (2007) Effect of promoter and inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase enzyme on stem bending of cut gerbera flowers. Acta Horticulture 775: 471-476.

FloraHolland. Royal flora Holland. (2016) Available online at: http://www.flowerzone.co.nz/industry.php

Guosheng, L., Dejuan, T., Fadi, C., Ya, S., Weimin F., Zhiyong, G., Zhaolei, L. and Sumei, C. (2011) The anatomy and physiology of spray cut chrysanthemum pedicels, and expression of a caffeic acid 3-O-methyltransferase homologue. Postharvest Biology and Technology 60: 244–250.

Halvey, A. H. and Mayak, S. (1979) Senescence and Post-harvest physiology of cut flowers. part I. Reviwe 1: 204-236.

Hunter, D. A., Ferrante, A., Vernieri, P. and Reid, M. S. (2004) Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodi (*Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master'). Physiology Plantarum 121: 313-321.

He, S., Joyce, D. C., Irving, D. E. and Faragher, J. D. (2006) Stem blockage in cut Grevillea 'Crimson Yul-lo' inflorescences. Postharvest Biology and Technology 41: 78-84.

Hema, P., Bhaskar, V. V., Bhanusree, M. R. and Suneetha, D. S. (2015) Studies on the effect of different chemicals on the vase life of cut gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook) cv. Alppraz. Plant Archives 15: 963-966.

Hoogerwerf, A. and Van Doorn, W. (1992) Numbers of bacteria in aqueous solutions used for postharvest handling of cut flowers. Postharvest Biology and Technology1: 295-304.

Imberty, A., Goldberg, R., Catesson, A. M. (1985) Isolation and characterization of populus isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. Planta 164: 221–226.

Invitrogen. (2007) Pentrtm directional topo cloning kits. Available online at: http://www.invitrogen.com/.

Nazarideljou, M. J., Khalighi, A., Arab, M. and Karamyan, R. (2011) Postharvest evaluation of vase life, stem bending and screening of cultivars of cut gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f.) flowers. African Journal of Biotechnology 10: 560-566.

Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. (2002) Gateway vectors for Agrobacterium- mediated plant transformation. Trends Plant Science 7:193-195.

Kim, S. J., Kim, M. R., Bedgar, D. L., Moinuddin, S. G., Cardenas, C. L., Davin, L. B., et al. (2004) Functional reclassification of the putative cinnamylalcohol dehydrogenase multigene family in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 101: 1455–1460.

Koncz, C., Nemeth, K., Redei, G. P. and Scell, J. (1994) Homologous recombination and gene silencing in plants. Kluwer Dordrecht the Netherlands 28: 130-141.

Lauvergeat,V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D. and Grima- Pettenati, J. (2001) Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from Arabidopsis thaliana are differentially expressed during developmentand in response to infection with pathogenic bacteria. Phytochemistry 57: 1187–1195.

Li, L., Cheng, X. F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S. A. and Chiang,V. L. (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiospermsis regulated by a novel gene encoding sinapyl alcoholdehydrogenase. Plant Cell 13: 1567–1585.

Livak, J. and Schmittgen, D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. Methods 25:402-408.

Mercurio, G. (2004) Gerbera cultivation in greenhouse. Schreurs, Holland.

Mlynarova, L. A., Heldens, J., Jansen, R. C., Keizer, P., Stiekema, W. J. and Nap, J. P. (1994) Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozume matrix- associated region. Plant Cell 6:417-426.

Nazarideljou, M. J., Pour Youssef, M., Karamian, R. and Jaberian Hamedani, H. (2012) Effect of cultivar on water relations and postharvest quality of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f.) cut flower. World Applied Sciences Journal 18: 698-703.

Passardi, F., Penel, C. and Dunand, C. (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends Plant Science 9: 534-540.

Peach, C. and Velten, J. (1991) Transgene expression variability position effect of CAT and Gus reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. Plant Molecular Biology 17:49-60.

Perik, R. R., Raze, D., Ferrante, A. and van Doorn, W. G. (2014) Stem bending in cut *Gerbera jamesonii* flowers: Effects of a pulse treatment with sucrose and calcium ions. Postharvest Biology and Technology 98: 7-13.

www.SID.ir

Archive of SID

Poovaiah, B. W. and Leopold, A. C. (1973) Defferal of leaf. Senescence with calcium. Plant physiology 52:236-239.
Rene, R. J., Dephine, R., Harmannus, H., Yuan, Z. and van Doorn, G. (2012) Bending in cut *Gerbera jamesonii* flowers relates to adverse water relations and lack of stem sclerenchyma development, not to expansion of the stem central cavity or stem elongation. Journal of Postharvest Biology and Technology 74: 11–18.
Ring, L.,Yeh, S. Y., Hücherig, S., Hoffmann, T., Blanco-Portales, R., Fouche, M., et al. (2013) Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis isassociated with peroxidase FaPRX27 in strawberry fruit. Plant Physiology 163: 43–60.
Van Doorn, W. G. and Witte, Y. D. (1994) Effect of bacteria on scape bending in cut gerbera jamesonii flowers. Journal of the American Society for Horticultural Science 119: 378- 657.
Van Meeteren, U. (1978a) Water relations and keeping quality of cut Gerbera flowers.I. The cause of stem break. Scientia Horticulturae 8: 65–74.
Van Meeteren, U. (1978b) Water relations and keeping quality of cut Gerbera flowers.II. Water balance of ageing flowers. Scientia Horticulturae 9: 189–197.
Van Meeteren, U. (1979) Water relations and keeping quality of cut gerbera flowers. Scientia Horticulture 10:261-269.
Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. (2010) Lignin Biosynthesis and Structure. Plant Physiology 153: 895–905.
Wang, R., Zheng, X. and Xu, X. (2014) Evidence for physiological vascular occlusion in stems of cut gerbera cv. Hongyan. Journal of Agricultural Science and Technology 16: 365-372.
Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjaersgard, I. V., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Jespersen, H. M., etal. (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from Arabidopsis thaliana. European Journal of Biochemistry 269: 6063–6081.
Weng, J. K. and Chapple, C. (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. New Phytologist 187: 273-285.
Whetten, R. W., MacKay, J. and Sederoff, R. (1998) Recentadvancesin understanding lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 49: 585–609.
Yan, Y. (2016) Effects of some preservative solutions on vase life in gerbera jamesonii. Master Thesis, Massey Universty, Palmerston North, New Zealand.
Yeh, S. Y., Huang, F. G., Hoffmann, T., Mayershofer, M. and Schwab, W. (2014) FaPOD27functionsin the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (Fragariasp.). Frontiers in plant science.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

www.SID.ir

Archive of SID

Functional role of peroxidase gene in the resistance of the cut gerbera flower (*Gerbera jamesonii*) to stem bending disorder

Hamideh Jaberian Hamedan[1], Mohammad Mehdi Sohani[1*], Ali Aalami[1], Mohammad Javad Nazarideljou[2]

[1] Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Mahabad Branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran
(Received: 04/09/2017, Accepted: 03/01/2018)

Abstract

Peroxidase is one of the most important genes in the lignin biosynthesis pathway. The main functions of this enzyme are polymerization of the phenolic derivatives into lignin, a connection between cell wall polymers such as monolignules, and consequently, cell wall strength. Accordingly, endogenous *POD* gene was isolated and cloned into gateway expression vector (PK7WG2) containing CAMV 35S promoter. *Agrobacterium*-mediated transformation was performed to induce the construction of gerbera 'Panorama' cultivar. Following regeneration, putative transgenic plantlets were transferred to a soilless greenhouse. Molecular analysis of second-generation of transgenic plants by real-time PCR confirmed the presence of both internal and transgene in transgenic plants. In compared to wild-type, the POD enzyme activity was increased significantly in transgenic plants. Based on the results, transgenic plants showed higher enzyme activity and as a consequence less stem bending disorder than wild-type with lower enzyme activity and higher stem bending degree. Also, flower quality indices such as vase life and cell membrane stability in transgenic plants increased significantly compared with control. Transfer of transgen *POD*, in addition to improving the qualitative parameters of flower and increasing the water uptake by the flowering stem, significantly reduced the stem bending disorder of gerbera cut flower.

Key words: Lignin biosynthesis, Postharvest quality, Stems bending, Transgenic gerbera, Vase life

***Corresponding author, Email: msohani@guilan.ac.ir**

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:10 IRDT on Sunday August 4th 2019

www.SID.ir